



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA
CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA

GEORGE MARTINS DA CUNHA

**ELABORAÇÃO DE *CHECK LIST* PARA PLANEJAMENTO E EXECUÇÃO DE
EXPERIMENTOS NA PRODUÇÃO DE MICROALGAS EM SISTEMA SEMI-CONTÍNUO**

Florianópolis/SC

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA
CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA

GEORGE MARTINS DA CUNHA

**ELABORAÇÃO DE *CHECK LIST* PARA PLANEJAMENTO E EXECUÇÃO DE
EXPERIMENTOS NA PRODUÇÃO DE MICROALGAS EM SISTEMA SEMI-CONTÍNUO**

Trabalho referente à disciplina de Estágio Supervisionado II, do Curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para conclusão de curso.

Orientador: Gilberto J. P. Onofre de Andrade.

Supervisor: Gilberto J. P. Onofre de Andrade.

Florianópolis/SC

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

MARTINS DA CUNHA, George

Elaboração de *Check List* para planejamento e execução de experimentos na produção de microalgas em sistema semi-contínuo. George Martins da Cunha – Florianópolis, 2014.

46 p.: 26 figs., 8 tabs.

Orientador: Gilberto J. P. O. de Andrade, Dr.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – Curso de Engenharia de Aquicultura.

1. Microalga, 2. Projeto, 3. Semi-contínuo.

*“Não é verdade. Todos os seres criados
debaixo do sol, dos pássaros às montanhas, das
flores aos rios, refletem a maravilha da criação.*

*Se resistirmos à tentação de aceitar que os
outros podem definir quem somos, então pouco a
pouco seremos capazes de fazer luzir o sol que
reside em nossa alma”*

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

A minha família, por em todos os momentos me apoiarem,

Aos meus amigos, por sempre estarem presentes de alguma forma,

Aos professores da graduação que distribuem os seus conhecimentos,

À todos do Laboratório de Moluscos Marinhos, por me receberem bem neste,

Ao Gilberto, Simone e Francisco pela oportunidade do desenvolvimento deste,

Em especial a Jaqueline e Adenilson por partilharem seu conhecimento prático na área,

E a energia, que nunca nasce ou morre, sempre se transforma.

RESUMO

Este trabalho visa à elaboração de um *check list* para planejamento de execução de projetos na área de cultivo de microalgas. Através da realização de um experimento piloto no cultivo da microalga *Chaetoceros muelleri* em sistema semi-contínuo realizado nas dependências do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) no primeiro semestre de 2014, utilizando este para identificação de pontos críticos do sistema, avaliação das estruturas utilizadas e propor melhorias. Contudo, após análise dos resultados e procedimentos do experimento piloto, produziu-se um *check list* baseado no conjunto de perguntas que auxiliam no planejamento e elaboração de experimentos nesta área.

Palavras Chaves: microalgas, projeto, semi-contínuo.

ABSTRACT

This paper aims to draw up a checklist for planning implementation of projects in the area of cultivation of microalgae. By conducting a pilot experiment in the cultivation of microalgae *Chaetoceros muelleri* in semi-continuous system held on the premises of the Laboratory of Marine Mollusks (LMM) of the Federal University of Santa Catarina (UFSC) in the first half of 2014, using this to identify points critical system, evaluation of the structures and propose improvements. However, after analysis of the results and procedures of the pilot experiment produced a checklist based on the set of questions that assist in the planning and design of experiments in this area.

Key Words: microalgae, design, semi-continuous.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metodologia utilizada para desenvolvimento do <i>check list</i>	11
Figura 2 – Esquema de preparação do inóculo para sistema de cultivo	13
Figura 3 – Foto do Cepário do LMM, ilustrando o processo de preparo do inóculo	13
Figura 4 – a (esq)–Foto das bolsas plásticas utilizadas para cultivo no LMM; b (dir) - Foto dos tanques de fibra utilizados para cultivo no LMM	16
Figura 5 – a (esq) – Foto dos tanques de fibra utilizados para cultivo no LMM; b (dir) – Foto do cultivo de microalga em fotobiorreator na Patagônia.....	16
Figura 6 – Gráfico de crescimento de microalgas em sistema estático.....	18
Figura 7 – Esquema de sistema de cultivo contínuo controlado por turbidostato	19
Figura 8 – Gráfico de crescimento da microalga em sistema semi-contínuo	20
Figura 9 – a (esq) – Foto da câmara de Neubauer; b (dir) – Microalga <i>C. muelleri</i> observada em microscópio na câmara de Neubauer	21
Figura 10 – a (esq) – Foto do Coulter Counter na sala seca do LMM; b (dir) – Foto do painel de controle do Coulter Counter	22
Figura 11 – Esquema representativo do experimento piloto.....	23
Figura 12 – Foto do interior do novo Cepário do setor de microalgas do LMM.....	24
Figura 13 – Esquema e foto da disposição e distribuição dos garrafões e tratamentos	27
Figura 14 – a (esq) – Fotos dos garrafões após inoculação; b (dir) – Foto do inóculo utilizado ...	28
Figura 15 – Coleta de amostras dos tratamentos para contagem e outros parâmetros no tempo T2	29
Figura 16 – Situação dos garrafões após colheita no tempo T2	29
Figura 17 – Processo de reposição de meio de cultura no tempo T2.....	30
Figura 18 – Foto da elaboração das placas com meio TBS para verificação de contaminação por vibrio feita na câmara de fluxo do setor de microalgas do LMM	32
Figura 19 – Foto das placas do inóculo e água do sistema vermelho do LMM após 48h em estufa para verificação de contaminação por vibrio.....	34
Figura 20 – Foto de 1ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 8 de maio de 2014, no LMM	35
Figura 21 – Foto da 1ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 8 de maio de 2014no LMM, na manhã seguinte ao início do experimento, já em processo de desmontagem deste	35
Figura 22 – Gráfico do crescimento da microalga <i>C. muelleri</i> em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, realizada no LMM – UFSC, 2014	37
Figura 23 – Gráfico da temperatura do cultivo da microalga <i>C. muelleri</i> em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, realizada no LMM – UFSC, 2014 ..	38
Figura 24 – Foto do crescimento da microalga <i>C. muelleri</i> em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, na 2ª tentativa e 4º dia de cultivo (T4), realizado no LMM – UFSC, 2014	39
Figura 25 – Foto do crescimento da microalga <i>C. muelleri</i> em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, na 2ª tentativa e 6º dia de cultivo (T6), realizado no LMM – UFSC, 2014	39
Figura 26 – Foto do crescimento da microalga <i>C. muelleri</i> em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, na 2ª tentativa e 8º dia de cultivo (T8), realizado no LMM – UFSC, 2014	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista das espécies de microalgas mais utilizadas na malacocultura	12
Tabela 2 – Faixa de temperatura, salinidade e Luminosidade para a produção de microalgas	14
Tabela 3 – Composição dos meios de cultura Guillard F/2, Conway e Algal1, por litro	15
Tabela 4 – Cronograma do Experimento Piloto.....	25
Tabela 5 - Volumes de colheita de cada tratamento e de reposição a serem preparados	30
Tabela 6 – Informações sobre os garrafões utilizados na 1ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 8 de maio de 2014 no LMM	36
Tabela 7 – Valores da densidade celular (cel.mL^{-1}) dos tratamentos na 2ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 21 de maio de 2014 no LMM	36
Tabela 8 – Temperatura apresentada durante a colheita nos tratamentos da 2ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 21 de maio de 2014 no LMM	37

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Contextualização	9
1.2. Justificativa	10
1.3. Objetivo Geral	11
1.4. Objetivos Específicos	11
1.5. Metodologia da análise do sistema	11
2. REVISÃO TEÓRICA	12
2.1. Cultivo de Microalgas	12
2.2. Sistemas de Cultivo	16
2.2.1. Sistema Estático	17
2.2.2. Sistema Contínuo	18
2.2.3. Sistema Semi-contínuo	19
2.3. Controle do Cultivo	20
3. EXPERIMENTO PILOTO	23
3.1. Materiais	24
3.2. Cronograma	25
3.3. Metodologia do experimento	25
3.3.1. Preparo do Inóculo	25
3.3.2. Preparo dos garrafões	26
3.3.3. Inoculação dos garrafões	27
3.4. Manejo	27
3.4.1. No dia inicial do cultivo (T ₀)	27
3.4.2. Na colheita (T _n , T _{PARES})	28
3.5. Quantificação	31
3.6. Medição do pH e temperatura	31
3.7. Medição de Salinidade	31
3.8. Análise Microbiológica	31
3.8.1. Preparação do material	32
3.8.2. Elaboração das placas	33
3.8.3. Descarte do material	34
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO do EXPERIMENTO	34
5. DISCUSSÃO e RESULTADO FINAL	40
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

As microalgas são a base da cadeia alimentar dos organismos aquáticos, parte importante do fitoplâncton e fundamental em processos biológicos e ecológicos, como organismos fotossintéticos, são responsáveis por mais de 90% da fotossíntese realizada nos mares e fundamentais nestes ecossistemas como produtores primários (LOURENÇO, 2006).

Apresentam uma grande variedade de espécies, com diferentes formas, tamanhos e pigmentos, ocupando assim diferentes nichos ambientais e, com isso, sendo exploradas industrialmente por diversos ramos como indústrias químicas, farmacêutica, alimentícia e outras (POLI; *et al*, 2004), e na última década, também explorada pela indústria de energia para a produção de biodiesel e outras fontes de energia limpa.

Já nos cultivos em aquicultura, de acordo com o organismo cultivado, a microalga pode ser o alimento único e principal em todo o ciclo produtivo, como no caso dos moluscos bivalves, ou nas fases iniciais de desenvolvimento, como no cultivo de camarões e peixes (POLI; *et al*, 2004), sendo que o ramo está em expansão, segundo a FAO (2014), a produção de pescados em 2012 atingiu o volume de 158 milhões de toneladas, onde 42% foram oriundos de cultivo.

Para tal alimentação nos sistemas aquícolas, as microalgas são cultivadas em sistemas distintos que são classificados de acordos com alguns parâmetros, dentre eles a presença de outros organismos nos cultivos (xênicos ou não axênicos). Quanto à localização do cultivo, sendo externos em tanque e outros, expostos à variações ambientais, ou internos, dentro de salas com ambiente controlado e iluminação artificial.

1.2. Justificativa

No Brasil, a malacocultura ocorre no litoral, atingindo um volume total de 18.541,7 toneladas no ano de 2011, com maior parte da produção obtida em Santa Catarina (MPA, 2012). No estado há predominância de três espécies de bivalves: o mexilhão (mitilicultura), a ostra do pacífico (ostreicultura) e a vieira (pectinicultura).

Na região da Grande Florianópolis está concentrado o cultivo de ostra, sendo a *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a principal espécie cultivada, o que, segundo a EPAGRI (2014), no ano de 2012 a produção de Florianópolis, o maior produtor do estado, atingiu o volume de 1.887 toneladas, apresentando um crescimento de 8% em comparação com o ano anterior.

Contudo, este desenvolvimento só foi obtido com o trabalho contínuo da parceria entre os maricultores e os órgãos estaduais e federais, como a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com o desenvolvimento de técnicas de cultivo e o fornecimento das “sementes” de ostra através do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), sediado na Barra da Lagoa, Florianópolis - SC, produzindo cerca de 50 milhões de “sementes” por safra.

Dentre as espécies de moluscos produzidas no LMM, as principais são a ostra do pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), a vieira *Nodipectennodosus* (Linnaeus, 1758) e a ostra nativa *C. gasar* (Adanson, 1757).

Os moluscos bivalves são organismos sésseis, em sua maioria, herbívoros e filtradores, que alimentam-se basicamente de microalgas. Com isso o consumo de grande quantidade diária, sendo considerado o grupo de maior consumo de microalgas entre todos os animais cultivados em aquicultura (RICHMOND, 2004). E como, em qualquer cultivo, a alimentação é a parte que mais gera custos na produção e que pode ser um agente restritivo para tal, faz-se necessário a produção de microalgas, em grande volume e qualidade, para a produção de ostras, nas suas fases iniciais em laboratório.

Devido a estes motivos, o LMM possui um laboratório interno de cultivo de microalgas, que atende toda a demanda do próprio laboratório e auxilia outros próximos. Este possui um cepário, onde são armazenadas as cepas das microalgas a serem utilizadas em condições ótimas de conservação e onde são realizadas as primeiras diluições sucessivas para preparo dos inóculos dos sistemas de cultivo. Uma sala de cultivo interna, nesta utilizam-se os sistema estático e o semi-contínuo, ambos em ambientes controlados. E por fim, uma parte final do sistema estático é realizado em tanques externos, com produção massiva destinada ao banco de reprodutores do LMM.

Como a migração de parte da produção de microalgas do sistema estático para o semi-contínuo é recente, faz-se necessário estudos para a validação e quantificação da eficiência deste sistema, bem como a determinação de pontos críticos e gargalos do sistema, visando a sua otimização.

Sendo a produção de microalgas a etapa inicial de produção de sementes de moluscos bivalves, a realização de pesquisas que ajudem a esclarecer pontos ainda obscuros é fundamental para o fortalecimento e modernização deste elo crucial na cadeia produtiva de moluscos no Brasil.

1.3. Objetivo Geral

Elaborar um *check list* para planejamento e execução de experimento na produção de microalgas em sistema semi-contínuo.

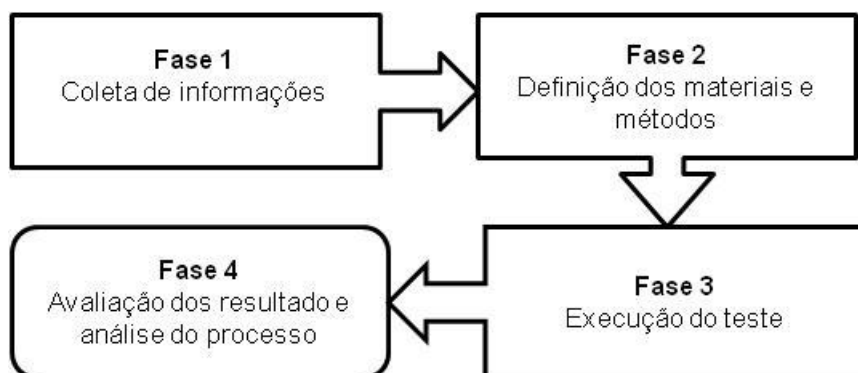
1.4. Objetivos Específicos

- Levantamento de informações sobre o processo produtivo de microalgas;
- Elaboração de um experimento piloto;
- Execução do experimento
- Identificação dos pontos críticos para o sucesso do experimento.

1.5. Metodologia da análise do sistema

Para a obtenção dos objetivos acima listados, optou-se pela realização do experimento piloto, após uma prévia coleta de informações do sistema de cultivo e a escolha da espécie a ser utilizada neste, conforme a figura 1 abaixo.

Figura1 – Metodologia utilizada para desenvolvimento do *check list*.



Fase 1 – Consiste numa revisão bibliográfica, buscando informações gerais sobre o cultivo de microalgas, comparando com o que o laboratório utiliza.

Fase 2 – Embasado na etapa anterior, a definição dos materiais e métodos a serem utilizados no experimento piloto, observando as técnicas já utilizadas e os materiais disponíveis no LMM.

Fase 3 – Realização do teste, validando as informações e indicadores das fases anteriores, bem como, o início da avaliação do processo (Fase 4).

Fase 4 – Análise dos resultados obtidos, avaliação do processo, como um todo, identificação de pontos críticos, sugestão de melhorias e elaboração do *check list* para futuros experimento no ramo.

2. REVISÃO TEÓRICA

2.1. Cultivo de Microalgas

Dentre as muitas espécies de microalgas utilizadas, na aquicultura, o cultivo está focado em determinadas espécies que, após estudos investigativos ao longo de décadas, possuem eficácia comprovada na sua utilização no cultivo de moluscos, crustáceo, peixes e outros animais cultivados.

No cultivo de moluscos bivalves, segundo RICHMOND (2004) e POLI *et al* (2004), as principais microalgas utilizadas estão listadas na tabela 1 abaixo, com o sua faixa de tamanho indicada para uso em cultivo de moluscos.

Tabela 1 – Lista das espécies de microalgas mais utilizadas na malacocultura.

Espécie	Classe	Tamanho (µm)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	<i>Bacillariophyceae</i>	2,5 – 8,0
<i>C. muelleri</i>	<i>Bacillariophyceae</i>	4,0 – 9,0
<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Bacillariophyceae</i>	6,0 – 10,0
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	<i>Bacillariophyceae</i>	2,5 – 10,0
<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Prymnesiophyceae</i>	2,0 – 7,0
<i>Pavlova lutheri</i>	<i>Prymnesiophyceae</i>	
<i>Tetraselmis sp.</i>	<i>Prasinophyceae</i>	8,0 – 12,0
<i>Nannochloropsis occulata</i>	<i>Chlorophyceae</i>	1,0 – 3-0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Chlorophyceae</i>	6,5

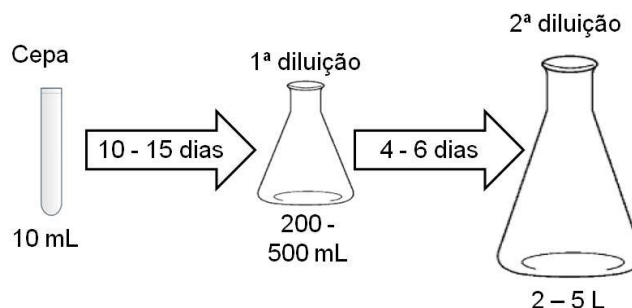
Fonte: Adaptado de RICHMOND (2004) e POLI *et al* (2004)

Para o cultivo destas microalgas, é indispensável o isolamento de uma microalga do meio natural para o início do cultivo (LOURENÇO, 2006), para tal processo, existem vários métodos que vão desde o isolamento por pipetagem e diluições sucessivas até a gravimetria na separação de células. No caso do LMM, este já possui um banco de cepas isoladas em câmara germinadoras.

A partir destas cepas, inicia-se o preparo do inóculo para o sistema de cultivo, que indiferente ao sistema a ser utilizado para a produção massiva, começando com o mesmo princípio que é de, a partir de uma cepa isolada, realizar um cultivo inicial em pequenos volumes, para aumentar o número de células algais afim de inocular o sistema de produção.

Iniciando estes cultivos em volumes que variam de 200 – 500 mL, e após determinado dias, quando a cultura atinge uma densidade desejada, é feita uma diluição desta em um volume maior, sendo utilizado de 2 – 5 L até a obtenção do volume e densidade desejada para a inoculação nos sistemas de cultivo, como demonstrado na figura 2 abaixo.

Figura 2 – Esquema de preparação do inóculo para sistema de cultivo.



O tempo entre as diluições variam de acordo com a espécie de microalga cultivada e quão densa se deseja a concentração final. No cultivo da cepa e da 1ª diluição, a microalga é colocada em água estéril e meio de cultura, sem aeração, e a partir da 2ª diluição, faz-se a introdução da aeração, com adição de CO₂ para viabilizar o crescimento da microalga. Este cultivo é realizado em uma sala específica do LMM, adjunto ao cepário, com ambiente controlado, como visto na figura 3.

Figura 3 – Foto da sala anexa ao Cepário do LMM, ilustrando o processo de preparo do inóculo.



Fonte: Cepário do LMM (2014).

O crescimento das microalgas está vinculado a fatores físicos (iluminação e temperaturas) e químicos (salinidade, pH e disponibilidades de CO₂) além nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, sendo a iluminação a responsável pelo maior custo de na produção (CRESWELL, 2010). Para possibilitar a iluminação adequada para o cultivo nas fases iniciais, segundo Lourenço

(2006), são utilizadas lâmpadas fluorescentes tubulares de potência entre 20 – 40 W, comumente encontradas no mercado, com o tipo de luz do dia, o que simulam o mais próximo o espectro luminoso solar. Além da potência e do tipo de espectro luminoso gerado, outro ponto importante a se observar quanto à iluminação é o da intensidade luminosa, mensurada em lux, e conforme a espécie exige determinada quantidade de lux.

A temperatura tem efeito direto sobre o metabolismo das microalgas, e segundo Poli, *et al* (2004), em sistemas fechados, as temperaturas ótimas variam de 15 – 27 °C para seu crescimento, porém algumas espécies não toleram temperaturas acima dos 22 °C. Apesar de, o cultivo externo de *C. muelleri*, durante o verão atingem temperaturas acima dos 30 °C.

De acordo com a espécie de microalga a ser cultivada, estas apresentam uma grande faixa de tolerância à variação da salinidade, aceitando valores entre 12 – 40 ‰, como observado na tabela 2 abaixo, onde estão relacionadas as espécies, com a faixa de temperatura, salinidade e luz indicada para o cultivo.

Tabela 2– Faixa de temperatura, salinidade e Luminosidade para a produção de microalgas.

Espécie	Temperatura (°C)	Luminosidade (lux)	Salinidade (‰ - ppt)
<i>Chaetoceros muelleri</i>	25 – 30	8.000 – 10.000	20 – 35
<i>Skeletonema costatum</i>	10 – 27	2.500 – 5.000	15 – 30
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	5 – 33	5.000 – 10.000	6 – 53
<i>Isochrysis galbana</i>	25 – 30	2.500 – 10.000	10 – 30
<i>Pavlova viridis</i>	15 – 30	4.000 – 8.000	6 – 53
<i>Nannochloropsis oculata</i>	20 – 30	2.500 – 8.000	0 -36

Fonte: Adaptado de CRESWELL, 2010.

Outro fator que se torna limitante no cultivo de microalga é a disponibilidade de CO₂, que é injetado nos cultivos através da aeração, através da adição do gás na linha de aeração, controlando-se a proporção deste, ou este reage com a água tornando-a mais ácida, ou seja, reduzindo o pH, que também é um fator que limita o crescimento das microalgas. No processo de crescimento, as algas retiram o CO₂ da água, colaborando com a elevação do pH, deixando em condições desfavoráveis para o seu cultivo (POLI; *et al*, 2004). Neste jogo entre a adição de CO₂ e o controle do pH, busca-se um valor em que as microalgas cresçam e o pH fique próximo a neutralidade (7,0).

A nutrição é outro ponto crucial para o cultivo, pois com a diversidade de espécies, alguns grupos necessitam de uma quantidade diferente de sais e outros elementos para o seu crescimento. Este conjunto é denominado meio de cultura, cuja sua intenção é se tornar o mais próximo a água marinha, que naturalmente possui uma grande gama de sais e nutrientes, porém nem todos em níveis ótimos, por isso a adição deste faz-se necessária para o cultivo.

Os meios de culturas podem ser criados a partir da junção da água marinha enriquecida com os minerais, chamada de natural, ou com o uso de água estéril destilada, acrescentando-se todos os

nutrientes, chamado de meio sintético. Para cultivos massivos, como no caso do LMM, é recomendado o uso de meio natural (POLI; *et al*, 2004).

Existem muitos meios de cultura já estudados, e dentre estes, segundo Poli, *et al* (2004), para o uso em algas marinhas se destacam F e F/2 (GUILLARD, 1975), Conway (WALNE, 1980) e Algal 1 (OLIVEIRA, 1998). Estes são produzidos em diversos volumes, de acordo com o consumo, mas na tabela 3 temos a formulação para 1 litro de meio de cultura, utilizando água marinha devidamente filtrada e esterilizada.

Tabela 3 – Composição dos meios de cultura Guillard F/2, Conway e Algal1, por litro.

Componentes	Quantidade dos componentes (mg.L ⁻¹)		
	Guillard F/2	Conway	Algal1
NaNO ₃	75,00	100,00	170,00
NaH ₂ PO ₄	5,00	20,00	11,90
NaSiO ₃ .9H ₂ O*	15,00 – 30,00	40,00	61,09
Na ₂ EDTA	4,36	45,00	70,00
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15	1,30	-
FeSO ₄	-	-	4,90
H ₃ BO ₃	-	33,60	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01	0,02	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022	-	0,10
ZnCl ₂ .7H ₂ O	-	0,02	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,010	0,02	0,017
MnCl ₂ .6H ₂ O	0,18	0,36	0,125
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006	-	0,205
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	-	0,018	-
Vitamina B ₁₂ (Cianocobalina)	0,0005	0,005	-
Vitamina H (Biotina)	0,0005	-	0,005
Vitamina B ₁ (Tiamina)	0,10	0,10	0,035

* - só para uso em diatomáceas

Fonte: Adaptado de POLI; *et al*, 2004.

Variações deste são comumente encontradas, adequando-a ao cultivo desejado.

2.2. Sistemas de Cultivo

De forma geral, os cultivos de microalgas são destinados a três fins distintos: pesquisa, manutenção de cepas e produção de biomassa, seja para fins comerciais de extração de alguma substância de interesse como para o uso como alimentação em cultivos (LOURENÇO, 2006).

Uma classificação geral é mediante a forma do cultivo, sendo divididos em estáticos ou de batelada (*batch*), e os sistemas contínuos, que por sua vez são subdivididos em semi-contínuo e contínuo. A realização destes ocorre em uma grande variedade de estruturas para o cultivo que vão de bolsas plásticas (figura 4 a), tanques (figura 4 b e 5 a) até longos circuitos de tubos translúcidos, denominados fotobiorreatores (figura 5 b), todos se adequando a finalidade, sistema de cultivo e volume a ser produzido.

Figura 4 – a (esquerda)–Foto das bolsas plásticas utilizadas para cultivo no LMM; **b (direita)** - Foto dos tanques de fibra utilizados para cultivo no LMM.



Fonte: Setor de Microalgas do LMM (2014).

Figura 5 – a (esquerda) –Foto dos tanques de fibra utilizados para cultivo no LMM; **b (direita)** – Foto do cultivo de microalga em fotobiorreator na Patagônia.



Fonte: a -Setor de Microalgas do LMM (2014), b - <http://www.ecologiaverde.com/biocombustible-a-partir-de-algas-de-la-patagonia/>, acessado em Jun/2014.

Também são classificados estes sistemas quanto ao número de espécies cultivadas, sendo chamados de unialgais (mono-específicos) os cultivos que apresentam apenas uma única espécie e quando cultivamos duas ou mais o cultivo é denominado pluri-algal (pluriespecífico) (POLI; *et al*, 2004).

Outra caracterização dos cultivos é quanto a presença de outros organismos no cultivo, que não sejam a microalga a que se destina, como por exemplo, bactérias, protozoários e outros contaminantes biológicos. Os cultivos que apresentam estes organismos são chamados de xênicos ou não axênicos. Estes organismos podem causar a perda do cultivo, pois podem figurar como competidores de nutrição, como até mesmo, predadores das microalgas cultivadas. Já os cultivos que não apresentam nenhum outro organismo, são denominados axênicos, o que de forma geral, é o mais desejado durante o cultivo.

2.2.1. Sistema Estático

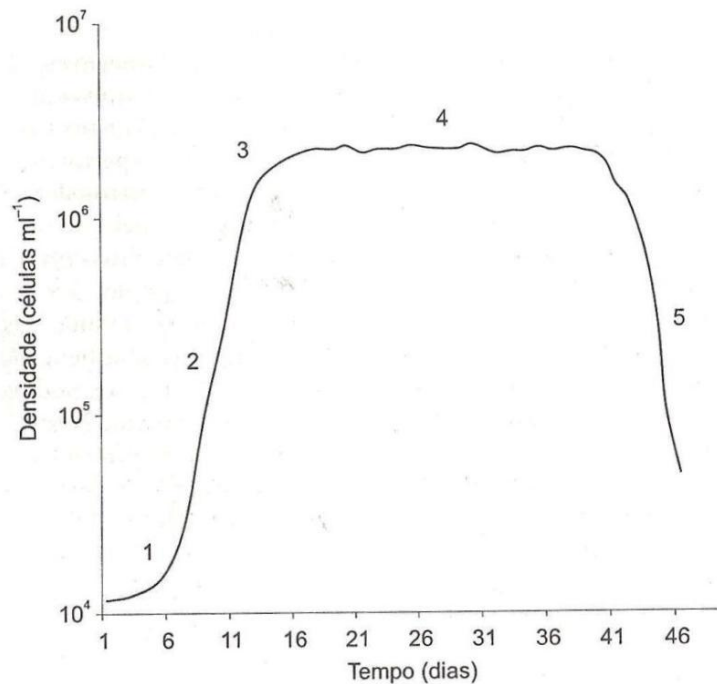
Também sendo denominado de sistema descontínuo ou de batelada, este consiste na inoculação da microalga em um recipiente estéril contendo água e nutrientes e que, após determinado tempo de crescimento, é diluído em outro recipiente com volume maior, e repetido o processo até a obtenção do volume final desejado onde ocorre a colheita total do sistema (POLI; *et al*, 2004). Realizando uma colheita total do sistema, que desde a inoculação até a colheita, não deverá ocorrer novas adições de meio e/ou reposição de nutrientes.

O crescimento das microalgas neste sistema ocorre em 5 fases distintas:

1. Fase de adaptação do inóculo ao meio atual e indução de seu crescimento - como o inóculo pode estar em condições diferentes da do cultivo, ocorre um choque inicial, causando um pequeno estresse no início do cultivo;
2. Fase de crescimento exponencial - onde o crescimento das células se eleva rapidamente devido aos fatores favoráveis;
3. Fase de redução do crescimento - ocorre uma redução nas taxas de crescimento devido a diminuição dos nutrientes.
4. Fase estacionária – nesta a densidade celular varia pouco, mantendo-se por determinado período, em uma faixa onde ocorre a ciclagem de nutrientes do cultivo no balanço entre uma determinada quantidade de células que morrem e outra que se multiplica, esta é a fase em que o cultivo atinge o seu rendimento máximo;
5. Fase de declínio – com o acúmulo de metabólitos resultantes da morte das várias células tornando o meio não adequado para a multiplicação celular. Culminando com a morte do cultivo.

O tempo que ocorre cada fase é variável de acordo com a espécie utilizada, meio de cultura e condições de cultivo, como podemos observar na figura 6 abaixo que exemplifica este comportamento no sistema estático.

Figura 6 – Gráfico de crescimento de microalgas em sistema estático.



Fonte: Lourenço, 2006.

No LMM, é utilizado este sistema para produção de grandes volumes destinados a alimentação de todas as fases de desenvolvimento das larvas dos moluscos bivalves.

2.2.2. Sistema Contínuo

Este sistema é o mais complexo dentre todos pelo fato que exige um controle apurado do sistema inteiro, pois por ocorrer a constante recarga de meio de cultivo no sistema, simultaneamente com a retirada contínua de microalgas, mantendo o volume constante, requer sistemas de medição e controle de vazão na entrada e saída, bem como também o monitoramento contínuo do estágio de crescimento da microalga.

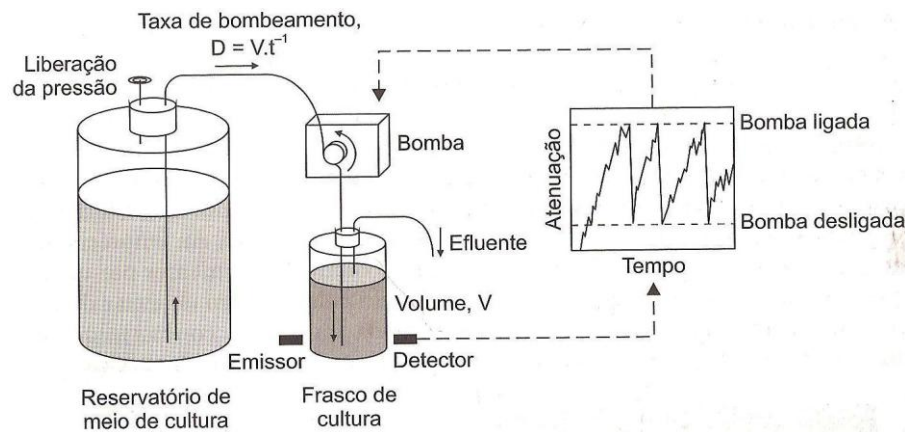
Como o volume deste sistema é constante, a colheita, em comparação com o sistema estático, é iniciada quando se atinge a fase 4, ou seja, quando ocorre a estabilização da densidade celular e a qualidade da microalga, tendendo a se manter constante durante a colheita.

Devido ao fato de ser necessário um maior controle deste sistema, em comparação com os outros, este é mais oneroso inicialmente, pois o nível de automação exigida para o bom funcionamento deste é grande. Especialmente se este for realizado em sistema fechado, ou seja, o

cultivo não possui contato direto com o meio externo, ficando isolado do ambiente, o que reduz em muito o risco de contaminantes, porém eleva o seu custo de implantação. Estes sistemas fechados são denominados fotobiorreatores.

Segundo Lourenço (2006), os cultivos contínuos utilizam dois tipos de controladores distintos, o turbidostato, que mensura a turbidez do meio de cultura através de uma célula fotoelétrica, como demonstrado no esquema da figura 7, e o quimiostato, que controla o nível de crescimento do cultivo através da disponibilidade de nutrientes no meio.

Figura 7 – Esquema de sistema de cultivo contínuo controlado por turbidostato.

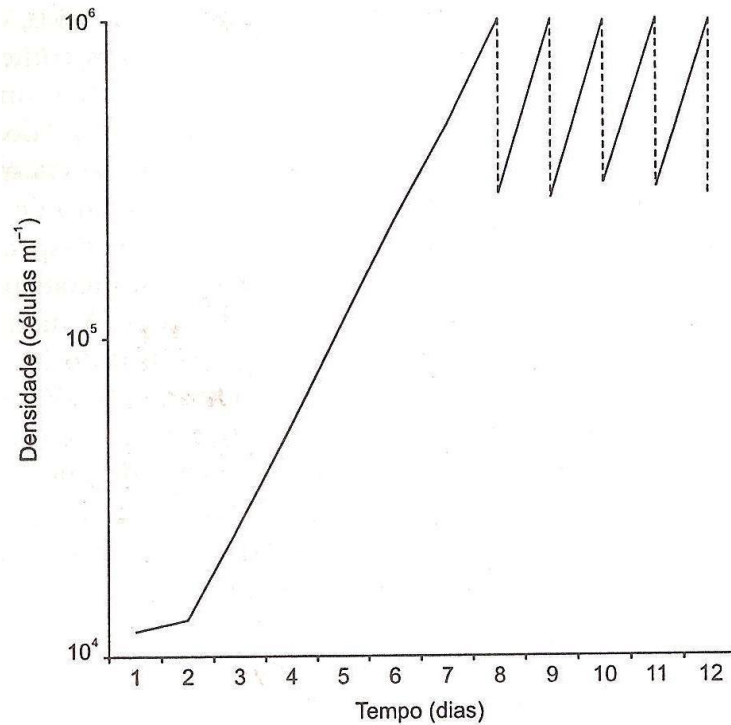


Fonte: Lourenço, 2006.

2.2.3. Sistema Semi-contínuo

O sistema semi-contínuo é o intermediário entre o estático e o contínuo, onde há colheitas parciais em tempos determinados, e após esta, a reposição de meio de cultura dos recipientes, com isso, a microalga sempre tende a ficar entre a fase 2 e 3 de crescimento. E devido ao fato das condições do meio de cultura repostado ser o mesmo contido no recipiente, o choque fisiológico que sofrem é mínimo, retomando rapidamente seu crescimento, como podemos observar na figura 8 abaixo, que retrata o crescimento da microalga em sistema semi-contínuo.

Figura 8 – Gráfico de crescimento da microalga em sistema semi-contínuo.



Fonte: Lourenço, 2006.

Uma das vantagens deste sistema é a longevidade da cultura, visto que uma vez realizado em recipientes fechados, de acordo com o percentual de colheita, aspectos biológicos e de manejo do cultivo, a mesma cepa inoculadora pode manter-se produtiva por um período acima de 90 dias (POLI; *et al*, 2004), reduzindo assim o preparo constante de novos inóculos para cultivo.

O LMM já utiliza, em parte do seu processo de produção o sistema semi-contínuo em bolsas de 100 L. Estas bolsas possuem válvulas para a colheita parcial, contribuindo na produção quando existe uma grande demanda.

2.3. Controle do Cultivo

O controle dos parâmetros abióticos do cultivo de microalgas é fundamental para o sucesso do cultivo, realizando-se a inspeção visual e conferência de odores e coleta de alguns fatores que influenciam diretamente o cultivo, como pH, temperatura e salinidade. Até o ponto de, como no caso de sistemas contínuos, fechados em fotobiorreatores, uso de sensores de luminosidades, condutividade elétrica do meio e outros.

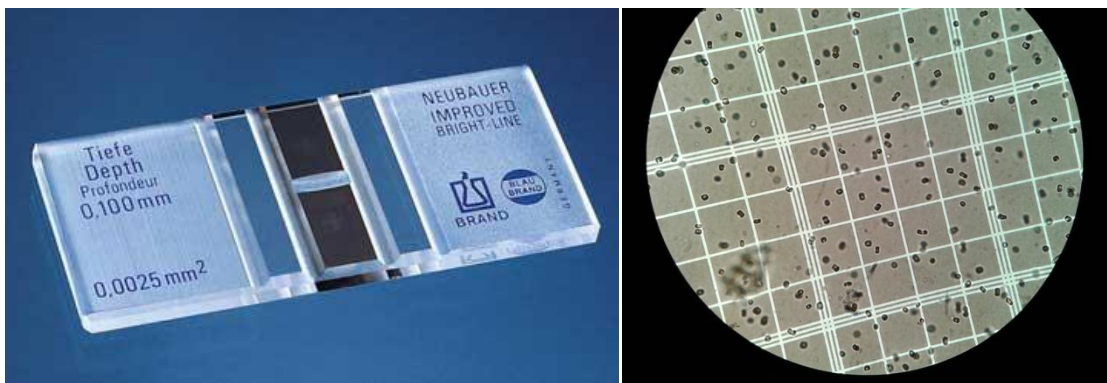
Também é importante a observação em microscópio para a verificação da qualidade do cultivo, entrada de patógenos e outras características visuais, além da quantificação do número de células por mL do cultivo (densidade), para contabilizar o crescimento das microalgas ao longo do tempo de cultivo.

A contagem das microalgas pode ser realizada de diversas maneiras:

- Contagem manual - realizada em microscópio, utilizando-se uma lâmina graduada para a contagem das células, chamada de hemacitômetro;
- Contagem direta – através de aparelhos automáticos que contam as partículas em suspensão em meio líquido;
- Contagem indireta – utilizando medidas indiretas, como a obstrução de um feixe luminoso ou quantidade de clorofila extraída de determinado volume, é possível ter uma estimativa próxima da densidade do cultivo.

Na contagem manual no LMM, o hemacitômetro utilizado é a câmara de Neubauer (figura 9 a), onde são observadas e contabilizadas as microalgas cultivadas (figura 9 b), sendo um método rápido de contagem, quando não há um número grande de amostras.

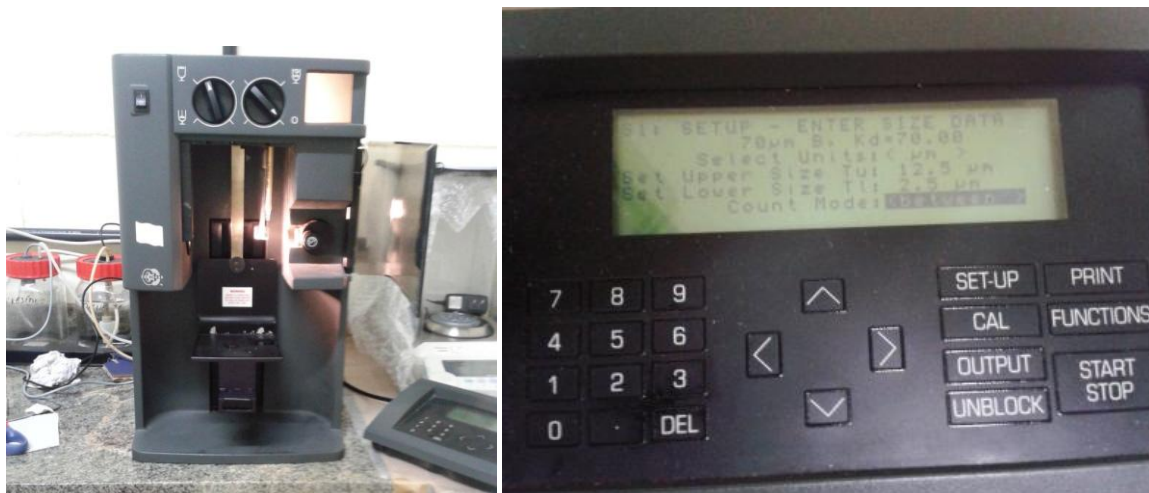
Figura 9 – a (esquerda) – Foto da câmara de Neubauer; **b** (direita) – Foto da Microalga *C. muelleri* observada em microscópio na câmara de Neubauer.



Fonte: LMM, 2014.

Outra forma de quantificar as microalgas é a contagem direta, o LMM dispõe desta através do uso de um contador de partículas Coulter Counter (CC) (figura 10 a), este possui rotinas de contagem pré-estabelecidas onde é necessária a introdução de alguns parâmetros, como faixa de tamanho de partícula a ser considerada, diluição da amostra, entre outras através de seu painel de controle (figura 10 b).

Figura 10 – a (esquerda) – Foto do Coulter Counter (CC) na sala seca do LMM; **b (direita)** – Foto do painel de controle do Coulter Counter (CC).



Fonte: LMM, 2014.

Como nesta não há uma clara visualização das células contabilizadas e o equipamento faz a contagem de todas as partículas que estejam suspensas no meio líquido dentro da faixa de tamanho definido, pode ocorrer a contagem de outros organismos e fragmento de células, induzindo erro no valor obtido. Por isso é importante, indiferente do método de contagem, o acompanhamento em microscópio.

Outro fator que é de suma importância no controle do cultivo de microalgas é a mitigação de agentes contaminantes, para tal, o cuidado com a assepsia do local, dos materiais utilizados no dia a dia do cultivo, da filtragem e esterilização da água e meio utilizados e outros, além de também o nosso comportamento junto ao cultivo, são a chave da manutenção da qualidade do cultivo.

No LMM, mesmo sendo uma subdivisão do laboratório de cultivo de molusco, o setor de microalgas conta com utensílios próprios que são mantidos separados dos demais setores, além de outras práticas, como pedilúvio nos acessos e a não retirada dos materiais do setor para uso em outros setores.

3. EXPERIMENTO PILOTO

Para execução do experimento piloto, foi selecionado a micro alga *C. muelleri*, cultivando-a no sistema semi-contínuo, submetida a 3 tratamentos onde variou-se a taxa de colheita de 40, 60 à 80% do volume total (figura 11).

Figura 11 – Esquema representativo do experimento piloto.



Este experimento foi realizado na sala do novo cepário do setor de microalgas do LMM (figura 12), espaço este que ainda não tinha sido utilizado na prática.

Este contou com 3 repetições de cada tratamento, sendo que colheita foi realizada a cada 2 dias e a duração do cultivo experimental estipulado deste é de 30 dias. De cada repetição, no ato da colheita foi retirado 3 amostra para realização da contagem de células, medição de pH, temperatura e salinidade.

Optou-se por utilizar o volume máximo de 15 L devido ao fato observado de, durante os cultivos em bolsas plásticas no LMM, esta microalga apresentar formação de volume espumoso quando não apresentam mais condições ótimas na cultura e também de fazer com que as parciais de colheita apresentem valores mais fáceis de trabalhar.

Aproveitou-se a oportunidade para fazer também um teste piloto de utilização do novo espaço visando verificar o comportamento da sala com as novas instalações antes de se efetivar a mudança definitiva para este cepário.

Figura 12 – Foto do interior do novo Cepário do setor de microalgas do LMM.



Fonte: LMM, 2014.

3.1. Materiais

Para realização do experimento a lista de materiais e utensílios necessários é apresentada abaixo:

- Recipientes - 12 garrações de 20L;
- Meio de cultivo (Conway) inicial - 1 mL de meio por 1 L de água salgada (1mL/1L); 1 mL x 15 L = 15 mL x 9 garrações = 135 mL; Total do meio inicial = 200 mL;
- Inóculo (*Cm*) 500 mL/garração com 15L (microalga + F/2 Guillard) x 9 garrações = 4,5 L;
- Meio de cultivo para reposição: Conway (Tabela X);
- Sílica;
- Rolha de vedação para o garrafão com 3 vias (entrada de ar, colheita/reposição, saída de ar) – total de 12 unidades;
- Mangueira com conectores rígidos: uma para efetuar a colheita e outra para a reposição de água – total de 2 unidades;
- Recipientes para coleta de amostra: becker de 50 mL (3 becker / garrafão – 3 b x 9 g = 27 b) – total de 27 unidades;
- Recipientes para diluição de amostra para contagem: erlenmeyer de 300 mL (1 e / 1 b = 27 e) – total de 27 unidades;

- Pipeta volumétrica de 1 mL;
- Água marinha filtrada e estéril;
- Balde de 20 L (utilizado durante a colheita);
- Fonte de aeração com adição de CO₂;
- Contador de Partículas Coulter Counter (CC).

Além de materiais de uso comum do laboratório, como papéis toalha, bandeja para transporte das amostras, álcool para higienização, luvas, máscaras e outros.

3.3.1. Cronograma

O experimento teve previsão de duração de 50 dias, começou pela busca de informações (A), o preparo dos materiais e inóculo(P) e início do experimento propriamente dito (T) e análise dos resultados (R), como vemos na tabela abaixo.

Tabela 4 – Cronograma do Experimento Piloto

Fa ses	Dias (agrupados a cada 2 dias)																									
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
A	x	x	x	x	x	x	x	x																		
P				x	x	x	x	x																		
T								x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
R													x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Fonte: Dados do Experimento Piloto, 2014.

3.3. Metodologia do experimento

A seguir são apresentados os passos para execução do experimento.

3.3.1. Preparo do Inóculo

A partir da cepa de *C. muelleri*, o inóculo foi preparado da seguinte maneira:

- Erlenmeyer com meio de cultura Guillard f/2 (250 mL e 2.500 mL).
- Tubo de ensaio com 15 mL de cultura de microalga (cepas).
- Inocula-se o conteúdo do tubo de ensaio em um frasco (erlenmeyer) de 250 mL;

- Armazenar o erlenmeyer sob iluminação constante (luz do dia) e temperatura controlada (20°C) entre 4 e 5 dias para crescimento;
- Após o período de crescimento, o erlenmeyer de 250 mL está pronto para inocular o frasco (erlenmeyer) de 2.500 mL;
- O frasco (erlenmeyer) de 2.500 mL permaneceram crescendo por cerca de 4 a 5 dias sob iluminação constante, temperatura controlada e injeção de ar acrescido de Dióxido de Carbono(CO₂);
- Após o período de crescimento, o erlenmeyer de 2.500 mL está pronto para inocular o garrafão de 15.000 mL.

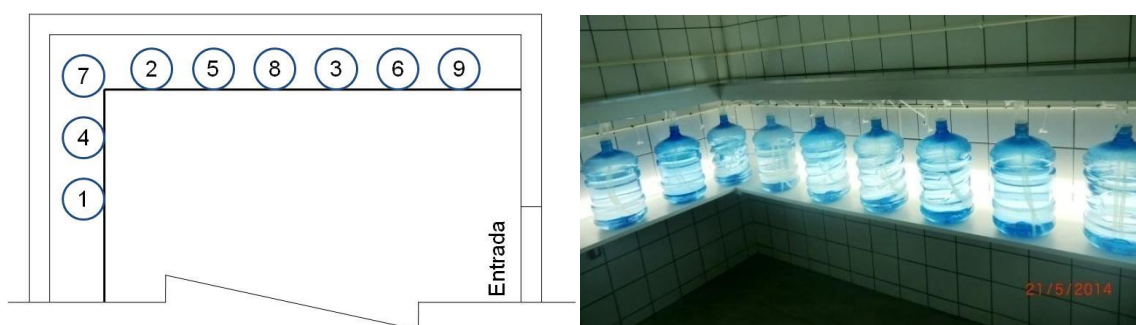
3.3.2. Preparo dos garrafões

Os recipientes utilizados foram garrafões utilizados no envasamento do de água mineral, que foram preparados conforme os procedimentos abaixo listados:

- Lavados com ácido clorídrico 20% (200 mL de ácido em 800 mL de água destilada);
- Enxaguados (3x) com água destilada;
- Cheios com água salgada filtrada (0,2 µm) em sua totalidade e adicionar cloro a 20 ppm;
- Vedados com rolha (rolhas esterilizadas já com os filtros - autoclave);
- Após 15 minutos o cloro foi neutralizado com tiosulfato;
- Ajustador o volume do garrafão (15 L) injetando ar na mangueira para a água sair;
- Adicionado os nutrientes (1 mL/L) utilizando seringas;
- Aclimatado (24 horas) os garrafões na temperatura utilizada no experimento (23 °C).

Os tratamentos foram separados da seguinte forma: T1 – C40%, garrafões de 1 à 3, T2 – C60%, garrafões 4 – 6 e T3 – C80% nos garrafões 7, 8 e 9. Quanto à disposição dos garrafões na sala, com não houve espaço suficiente no mesmo lado da prateleira, estes foram divididos no formato em L da mesma e os garrafões distribuídos conforme esquema observado na figura 13 abaixo, mantendo-os todos em condições idênticas.

Figura 13 – Esquema e foto da disposição e distribuição dos garrafões e tratamentos.



Fonte: Experimento piloto – LMM, 2014.

3.3.3. Inoculação dos garrafões

Após o preparo dos garrafões e do inóculo, cada um destes foi inoculado conforme:

- Após acomodação dos garrafões de água salgada no cepário;
- Foram inoculados os garrafões com mangueira autoclavada;

3.4. Manejo

O manejo deste experimento está subdividido em dois pontos, o dia inicial (T_0) e os demais dias de colheita (T_n , T_{PARES}).

3.4.1. No dia inicial do cultivo (T_0)

Com o inóculo pronto e os garrafões já em condições ideais, foi dado início ao experimento seguindo os procedimentos abaixo.

- Juntar (na câmara de fluxo laminar) os três inóculos de microalga (*Cm*) em um recipiente estéril (5 L) e separar uma amostra da mistura para:
 1. Contagem de microalgas (5 contagens);
 2. Análise microbiológica (3 placas).
- Fazer a inoculação (com cuidado para não contaminar o garrafão) de 500 mL por garrafão;

- Após inoculação, coletar (com a mangueira de ar conectando na rede de fornecedora de aeração) uma amostra da cultura de cada garrafão, para:
 - a) Contagem de microalgas (5 contagens);
 - b) Medir o pH (3 medidas);
 - c) Temperatura (3 medidas);
 - d) Salinidade (3 medidas).

Após a inoculação, todos os garrafões foram mantidos com aeração constante de forma moderada, com injeção de CO₂, apresentando uma fraca coloração oriunda das microalgas diluída no meio (figura 14 a) em comparação com a apresentada pelo inóculo (figura 14 b).

Figura 14 – a (esq) – Fotos dos garrafões após inoculação; **b** (dir) – Foto do inóculo utilizado.



Fonte: Experimento piloto – LMM, 2014.

Nos dias onde são realizados colheita, às 9h da manhã iniciando em T2, T4, Tn (T_{PARES}).

3.4.2. Na colheita (Tn, T_{PARES})

Nestes dias, além da colheita e contagem, outro procedimento efetuado, foi a reposição de meio, estes eram realizados conforme os tópicos abaixo:

- Coletar o volume de água de cada tratamento (C40%, C60% e C80%) sem contaminar o garrafão;
- Do volume coletado, separar 3 amostras de 10 mL de cada tratamento (figura 15) para:
 - a) Contagem de microalgas (5 contagens);
 - b) Medir o pH (3 medidas);
 - c) Temperatura (3 medidas);
 - d) Salinidade (3 medidas).

Figura 15 – Coleta de amostras dos tratamentos para contagem e outros parâmetros no tempo T2.



Fonte: Experimento piloto – LMM, 2014.

Como se pode observar acima, as amostras de 10 mL foram acondicionadas em copos plásticos de 80 mL (copinho de café), devido à falta de vidraria suficiente para deixar as amostras em condições homogêneas, sendo que estes copos eram reutilizados, passando por lavagem após o uso, ficando armazenado até sua próxima utilização.

- Após a colheita, o garrafão fica com o seu volume reduzido de acordo com o tratamento, como podemos observar na figura 16;

Figura 16 – Situação dos garrafões após colheita no tempo T2.



Fonte: Experimento piloto – LMM, 2014.

- Em seguida, era reposto água e meio nos garrafões, conforme a tabela 5 abaixo:

Tabela 5 - Volumes de colheita de cada tratamento e de reposição a serem preparados.

Descrição		Volume			Total
		T1 - C40%	T2 - C60%	T3 - C80%	
Colheita de microalgas (L)		6 L / garrafão	9 L / garrafão	12 L / garrafão	
Meio de cultivo para reposição	Água filtrada	6 L x 3 =	9 L x 3 =	12 L x 3 =	
	estéril	18 L	27 L	36 L	81 L
	Nutrientes	1 mL/L	1 mL/L	1 mL/L	
	(Sílica + Conway)	(6 mL/ garrafão) X 3 = 18 mL	(9 mL/ garrafão) x 3 = 27 mL	(12 mL/ garrafão) x 3 = 36 mL	81 mL

Fonte: Dados do experimento.

Este processo foi realizado com o auxílio dos garrafões de 20 L preparados no dia anterior, da mesma maneira que os utilizados no experimento e transferindo o meio para os utilizados no cultivo, como observado na figura 17 abaixo.

Figura 17 – Processo de reposição de meio de cultura no tempo T2.

Fonte: Experimento piloto – LMM, 2014.

Tanto nos processos de colheita, quanto no de reposição, foi utilizado mangueiras com ponteiros de vidro para a transferência do líquido, todas com marcações de entrada e saída distintas e higienizadas a cada uso para minimizar riscos de contaminação.

3.5. Quantificação

Neste experimento, optou-se pela contagem direta através do uso do contador eletrônico Coulter Counter (CC). Não foi descartada a contagem manual no microscópio, sendo realizada de maneira aleatória para comparação com os resultados obtidos pela contagem automatizada, bem como a verificação da sanidade do cultivo durante este processo.

O princípio de contagem do equipamento é o da diferença de potencial elétrico que, a partícula, causa no seu sensor ao ser transportado, pelo líquido condutor, em um orifício de abertura conhecida, causando de acordo com o tamanho da partícula, uma determinada impedância elétrica.

Para a contagem no CC, de cada amostra foi retirado 1 mL e diluída em 100 mL de água marinha estéril, e depois inserido 20 mL no aparelho para contagem, onde foram realizadas 5 contagens de cada repetição, totalizando 45 contagens. Porém, para a análise dos resultados foram consideradas apenas 3 contagens de cada repetição, sendo descartados o de maior e menor valor, por estes apresentarem maior probabilidade de erro e maior influência no resultado final.

3.6. Medição do pH e temperatura

A medição de pH e temperatura foram realizadas após a colheita, na sala seca do LMM com o uso do pHmetro de bancada da marca Alfakit, sendo coletado ambos os parâmetros de cada repetição.

3.7. Medição de Salinidade

A medição de salinidade foi realizada com de refratômetro de salinidade, coletando uma da amostra de cada repetição.

3.8. Análise Microbiológica

Para verificar a presença ou não de vibriónáceas foi realizada a análise microbiológica em meio TCBS em amostras da água utilizada e do inóculo.

3.8.1. Preparação do material

- Elaboração das placas com meio TCBS (meio de cultura para víbrionáceas)

Estas placas tem como finalidade a verificação da contaminação por *vibrio sp.* no cultivo, visto que está é uma bactéria comum em ambientes marinhos.

Para tal verificação, as placas foram elaboradas de seguinte forma:

- Pesar quantidade do meio conforme instruções no rótulo;
- Aquecer na autoclave (sem pressão) até a total dissolução do meio (meio translúcido), aproximadamente 15 minutos;
- Retirar da autoclave e deixar esfriar na sala de cepas (temperatura próxima de 40°C);
- Verter em placas de Petri estéreis, aproximadamente 30 mL por placa (figura 18);
- Guardar as placas na estufa a 25°C em posição invertida (mínimo 48h antes de utilizar).

Figura 18 – Foto da elaboração das placas com meio TBS para verificação de contaminação por víbrio feita na câmara de fluxo do setor de microalgas do LMM.



Fonte: LMM, 2014.

- Ponteiras das Pipetas 0,1mL

Para dosagem das amostras, foi utilizada pipeta automática que utilizam ponteiras descartáveis, e estas foram preparadas da seguinte forma:

- Envolver as ponteiras em papel alumínio (3 a 4 por pacote). Os pacotes deverão ser embrulhados em papel Kraft;
- Autoclavar por 15min a 121°C.

3.8.2. Elaboração das placas

Após as placas e as ponteiras estarem devidamente preparados, as placas foram colonizadas com amostra da água utilizada e do inóculo, seguindo os procedimentos relatados abaixo:

- Colocar na Câmara de Fluxo laminar, as amostras a serem plaqueadas, as placas com TCBS e o restante do material a ser utilizado.
- Seguir o rigor de assepsia de trabalhos com microbiologia, passar a alça no álcool e em seguida flambar (trabalhar sempre próximo a chama do bico de busen);
- Semear 0,1 mL com pipeta automática;
- Espalhar com alça de Drigalski até a total absorção pelo meio;
- Colocar para crescimento na estufa a 25°C.
- Após 48 horas fazer as contagens das UFC/mL.
- Fazer o cálculo da contagem, conforme exemplo abaixo:

$$\text{UFC} = (\text{n}^\circ \text{ colônia} * \text{diluição}) / 0,1 \text{ mL}$$

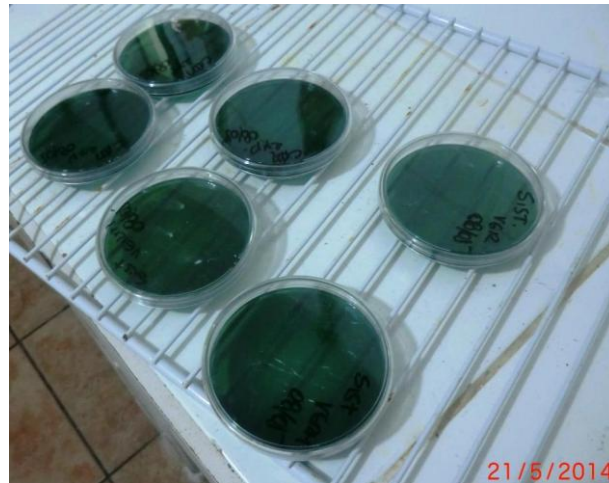
$$\text{UFC} = (55 * 10^0) / 0,1$$

$$\text{UFC/mL} = 550$$

Após o prazo de 48h não houve a presença de nenhuma colônia de vibrio, como observado na figura 19 abaixo.

Este procedimento seria repetido no 15º dia de cultivo e no final deste para verificação, porém nestes, com 3 amostras de cada cultivo, além da repetição do teste com a água oriunda do sistema vermelho.

Figura 19 – Foto das placas após 48h em estufa para verificação de contaminação por vibrio.



Fonte: Experimento piloto – LMM, 2014.

3.8.3. Descarte do material

Após as análises, faz-se necessário o correto procedimento de descarte para não acarretar numa possível fonte de contaminação para o ambiente, seguindo os passos abaixo:

- Colocar as placas em recipiente adequado;
- Autoclavar durante 15min a 121°C;
- Retirar da autoclave o material esterilizado, descartar o líquido formado, lavar com detergente e água doce e colocar no lixo.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO do EXPERIMENTO

Para a execução do experimento piloto houve duas tentativas, a 1ª iniciada em 8 de maio, montando o experimento conforme os procedimentos aqui descritos (figura 20), porém, no dia seguinte, 9 de maio, 5 dos garrafões inoculados não apresentavam mais microalgas, como observado na figura 21.

Figura 20 – Foto de 1ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 8 de maio de 2014, no LMM.



Fonte: Experimento piloto, 1ª tentativa – LMM, 2014.

Figura 21 – Foto da 1ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 8 de maio de 2014 no LMM, na manhã seguinte ao início do experimento, já em processo de desmontagem deste.



Fonte: Experimento piloto, 1ª tentativa – LMM, 2014

Após muitas perguntas sobre o que poderia ter ocasionado a morte das microalgas nos garrafões, e poucas respostas inicialmente, durante o processo de desmontagem observou-se que estes apresentavam data de fabricação mais recente, indiferente a marca, estas informações foram reunidas na tabela 6 abaixo.

Tabela 6 – Informações sobre os garrafões utilizados na 1ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 8 de maio de 2014 no LMM.

Galão	Fabricação	Marca	Vivo ?
1	dez/13	Europet	Não
2	nov/12	Revitec	Sim
3	set/13	Darioplast	Não
4	abr/13	Revitec	Sim
5	fev/14	Europet	Não
6	set/12	Europet	Sim
7	dez/13	Europet	Não
8	jul/13	Europet	Sim
9	fev/14	Europet	Não

Fonte: Experimento piloto – LMM, 2014

Com isso, fora trocados todos os garrafões com fabricação a partir de Julho/13, e realizado um novo bioensaio com todos os garrafões disponíveis, para o início de uma segunda tentativa do experimento piloto.

Em 21 de maior de 2014 iniciou-se novo experimento, após o processo de nova inoculação, este também não obteve sucesso, porém as causas do mau desempenho no crescimento das microalgas, como se pode observar na tabela 7 que apresenta os valores das colheitas realizadas durante a este deste, foram outras. Contudo este ainda perdurou por 8 dias de cultivo.

Tabela 7 – Valores da densidade celular (cel.mL^{-1}) dos tratamentos na 2ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 21 de maio de 2014 no LMM.

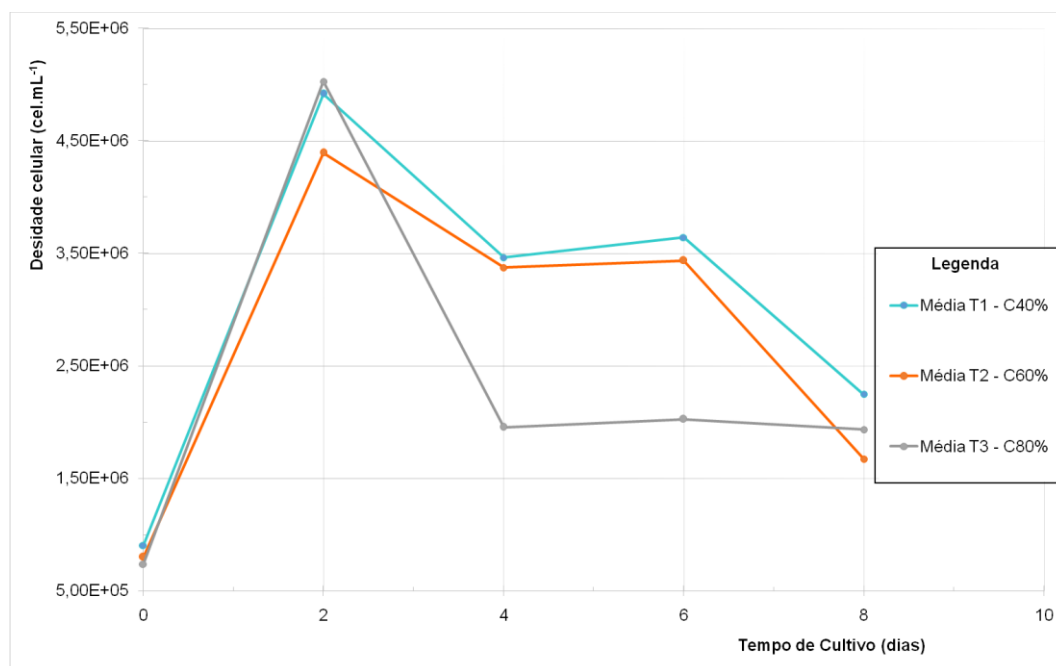
Tratamentos	Dia		21/mai	23/mai	25/mai	27/mai	29/mai
	Garrafão	Amostra	T0	T2	T4	T6	T8
T1 – C40%	1	1	1,538E+06	5,934E+06	3,548E+06	3,491E+06	3,235E+06
		2	1,261E+06	5,222E+06	3,696E+06	3,265E+06	2,997E+06
		3	1,228E+06	5,386E+06	3,386E+06	3,348E+06	3,022E+06
		Média	1,342E+06	5,514E+06	3,543E+06	3,368E+06	3,085E+06
	2	1	5,980E+05	3,545E+06	4,263E+06	4,375E+06	2,665E+06
		2	6,180E+05	3,899E+06	3,830E+06	4,295E+06	2,414E+06
		3	6,250E+05	5,049E+06	3,898E+06	4,400E+06	2,547E+06
		Média	6,137E+05	4,164E+06	3,997E+06	4,357E+06	2,542E+06
	3	1	8,670E+05	5,131E+06	2,914E+06	3,019E+06	1,040E+06
		2	7,140E+05	4,970E+06	2,888E+06	3,250E+06	1,109E+06
		3	6,780E+05	5,118E+06	2,736E+06	3,313E+06	1,187E+06
		Média	7,530E+05	5,073E+06	2,846E+06	3,194E+06	1,112E+06
T2 – C60%	4	1	9,540E+05	2,990E+06	1,565E+06	1,967E+06	1,029E+06
		2	8,560E+05	4,241E+06	1,596E+06	1,944E+06	1,045E+06
		3	8,400E+05	4,793E+06	1,772E+06	2,002E+06	1,012E+06
		Média	8,833E+05	4,008E+06	1,644E+06	1,971E+06	1,029E+06
	5	1	1,044E+06	3,882E+06	3,299E+06	2,769E+06	1,866E+06
		2	6,780E+05	3,830E+06	3,450E+06	3,127E+06	1,921E+06
		3	8,220E+05	3,840E+06	3,553E+06	3,363E+06	1,865E+06
		Média	8,480E+05	3,851E+06	3,434E+06	3,086E+06	1,884E+06
	6	1	6,780E+05	5,454E+06	5,542E+06	5,372E+06	2,163E+06
		2	6,410E+05	5,170E+06	4,887E+06	5,311E+06	2,155E+06

		3	6,780E+05	5,343E+06	4,700E+06	5,065E+06	1,993E+06
		Média	6,657E+05	5,322E+06	5,043E+06	5,249E+06	2,104E+06
T3 – C80%	7	1	7,030E+05	7,148E+06	1,451E+06	1,464E+06	1,116E+06
		2	8,370E+05	7,033E+06	1,559E+06	1,576E+06	1,576E+06
		3	6,640E+05	7,874E+06	1,565E+06	2,104E+06	9,710E+05
		Média	7,347E+05	7,352E+06	1,525E+06	1,715E+06	1,221E+06
	8	1	6,910E+05	4,850E+06	2,232E+06	1,330E+06	2,824E+06
		2	6,970E+05	4,482E+06	2,221E+06	1,245E+06	2,502E+06
		3	6,470E+05	5,249E+06	2,460E+06	1,312E+06	2,543E+06
		Média	6,783E+05	4,860E+06	2,304E+06	1,296E+06	2,623E+06
	9	1	8,260E+05	2,791E+06	1,970E+06	3,061E+06	1,936E+06
		2	8,060E+05	3,103E+06	2,087E+06	3,085E+06	1,937E+06
		3	7,470E+05	2,716E+06	2,034E+06	3,057E+06	1,983E+06
		Média	7,930E+05	2,870E+06	2,030E+06	3,068E+06	1,952E+06

Fonte: Dados do Experimento Piloto, 2ª tentativa – LMM, 2014.

Esta tabela está descrita na figura 22, onde representa o gráfico do crescimento da microalga nos tratamentos, através da média geral de cada.

Figura 22 – Gráfico do crescimento da microalga *C. muelleri* em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, realizada no LMM – UFSC, 2014.



Fonte: Experimento piloto, 2ª tentativa – LMM, 2014.

A partir do 4º dia de cultivo, os valores contabilizados são suspeitos, pois o cultivo já apresentava indícios da morte da microalga e formação inicial de grumos bacterianos, que ficaram evidentes no 8º dia de cultivo, inviabilizando a continuidade deste.

Ocorreu um decréscimo na temperatura do ambiente desde o início da 2ª tentativa, começando com a temperatura acima dos 21 °C no dia da inoculação, ficando abaixo dos 23 °C estabelecidos para este. E esta redução continuou, deixando abaixo da faixa ideal para o cultivo desta microalga, reduzindo sua taxa de crescimento, que pode ser observado na tabela 8, deixando esta abaixo dos 20 °C o que pode ter sido uma das causas da morte celular no cultivo.

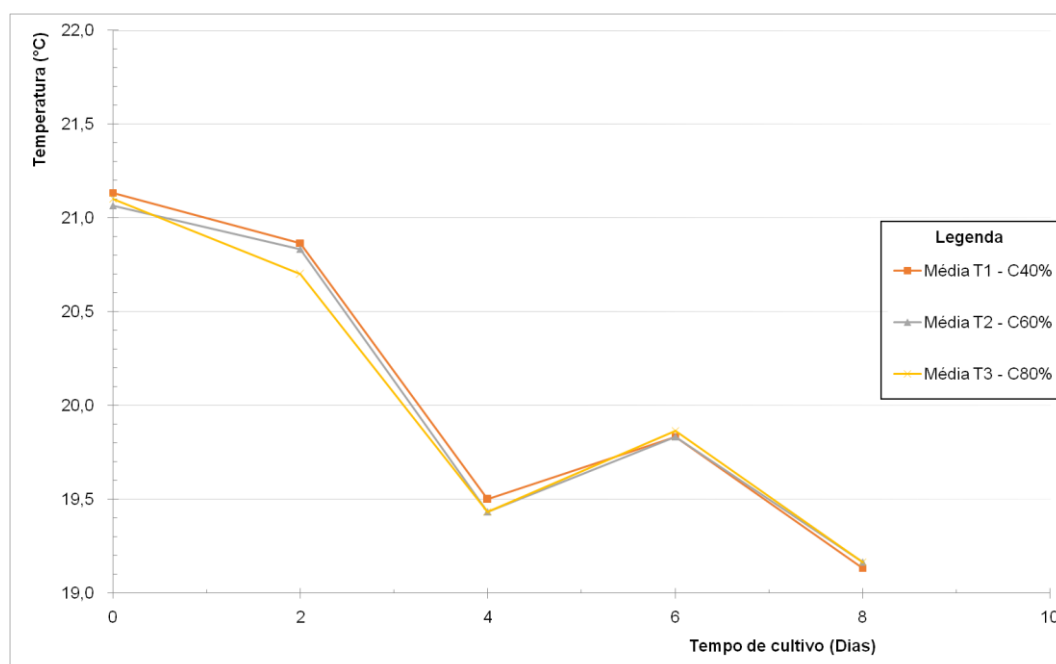
Tabela 8 – Temperatura apresentada durante a colheita nos tratamentos da 2ª tentativa do experimento piloto, iniciado em 21 de maio de 2014 no LMM

Tratamento	Dia	21/mai	23/mai	25/mai	27/mai	29/mai
	Garrafão	T0	T2	T4	T6	T8
T1 - C40%	1	21,5	20,7	19,8	20,1	19,1
	2	21,0	20,8	19,6	19,8	19,1
	3	21,0	20,7	19,4	19,8	19,5
T2 - C60%	4	21,2	20,8	19,7	19,1	19,0
	5	21,1	20,7	19,6	19,9	19,0
	6	21,1	21,0	19,3	19,8	19,4
T3 - C80%	7	21,2	20,9	19,6	19,8	19,0
	8	20,9	20,6	19,4	19,9	19,1
	9	21,2	20,6	19,3	19,9	19,4

Fonte: Dados do Experimento Piloto, 2ª tentativa – LMM, 2014.

Abaixo segue a figura 23, que traz o gráfico da média de temperatura nos tratamentos, embasada nos dados da tabela anterior.

Figura 23 – Gráfico da temperatura do cultivo da microalga *C. muelleri* em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, realizada no LMM – UFSC, 2014.



Fonte: Experimento piloto, 2ª tentativa – LMM, 2014.

Com estas mortes ocorreu o surgimento de grumos de células nas paredes dos garrafões a partir do 4º dia de cultivo, como visualizamos na figura 24 abaixo, que por sua vez foi o chamariz de organismos invasores, causando grande degradação no cultivo.

Figura 24 – Foto do crescimento da microalga *C. muelleri* em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, na 2ª tentativa e 4º dia de cultivo (T4), realizado no LMM – UFSC, 2014.



Fonte: Experimento piloto, 2ª tentativa – LMM, 2014.

Continuando o aumento dos grumos, como observamos na figura 25 abaixo, nos dias subsequentes do cultivo, representando o 6º dia de cultivo (T6).

Figura 25 – Foto do crescimento da microalga *C. muelleri* em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, na 2ª tentativa e 6º dia de cultivo (T6), realizado no LMM – UFSC, 2014.



Fonte: Experimento piloto, 2ª tentativa – LMM, 2014.

Culminando com a não viabilidade do cultivo do seu 8º dia (T8), como podemos ver na figura 26, onde já estava em processo de desmontagem do cultivo.

Figura 26 – Foto do crescimento da microalga *C. muelleri* em sistema de cultivo semi-contínuo com variação na taxa de colheita, na 2ª tentativa e 8º dia de cultivo (T8), realizado no LMM – UFSC, 2014.



Fonte: Experimento piloto, 2ª tentativa – LMM, 2014.

Contudo, mesmo não obtendo resultados consistentes do experimento em si, a realização deste propiciou a avaliação do processo experimental, bem como a identificação de algumas oportunidades de melhorias.

5. DISCUSSÃO e RESULTADO FINAL

O uso de garrações de água mineral para o cultivo de microalgas não é algo novo, tendo sido utilizado pelo LMM anteriormente, porém a partir da Portaria do Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) de nº 387, de 19 de Setembro de 2008, os garrações possuem prazo de validade de 3 anos, sendo substituídos após o seu vencimento.

Porém, todos os garrações de fabricação mais recente apresentaram mortalidade na 1ª tentativa do experimento piloto, o que leva a crer que, atualmente, as fábricas destas embalagens estão utilizando alguma substância que funciona como algicida, e que deve perder seu efeito após alguns ciclos de uso.

Ainda sobre os garrações, devido a não conformidade dos recipientes, tendo alguns de corpo cilíndrico simples e outros apresentando um modelo com estrias helicoidais nas paredes laterais

onde, especialmente neste último, apresentou maior concentração de grumos de células mortas nestas ranhuras.

Já, a respeito da 2ª tentativa, ficou evidente que a novo cepário do setor de microalgas, que ainda não está em uso, ainda necessita de ajustes, quanto ao quesito controle de temperatura, pois o equipamento neste instalado não é capaz de aquecer o ambiente, apenas resfriando quando a temperatura da sala é acima da configurada neste. Devido ao fato de estarmos na porção sul do país e do nosso continente, as condições geográficas fazem que tenhamos as quatro estações bem distintas, ocorrendo entradas de frentes frias, reduzindo a temperatura já em pleno outono, nos meses de abril e maio, como ocorreram neste ano de 2014.

Quanto as amostragem, viu-se que é trabalhoso e desnecessário a coleta separada de 3 amostras de pequeno volume, que podem ser substituídas por uma amostra única de maior volume, como neste caso de 1 L, de cada repetição, onde o “*pool* amostral” será satisfatório e possibilitando as 5 contagens.

Para uma melhor tomada de dados de temperatura e pH, o uso de um pHmetro e termômetro digital portátil reduzirá o tempo entre a colheita e o tomada destes valores, especialmente, devido as amostras serem de pequeno volume, em curto espaço de tempo sofriam influência da temperatura do ambiente.

Enfim, todos os experimentos aqui realizados foram na intenção de propiciar situações reais de experimentação em microalga para produção de um *check list* que será uma importante ferramenta para o planejamento e execução de futuros experimentos nesta área.

Contudo, alguns pontos críticos ficaram evidentes nestes experimentos, como a problemática do controle da temperatura, melhor definição dos processos de colheita, a questão da uniformidade dos vasilhames utilizados e por fim, a vulnerabilidade do sistema quanto à contaminação.

Estes pontos seguem aqui listados, com a justificativa do por que necessitam de atenção:

- **Controle de temperatura** – Como relatado neste, a microalgas possuem uma faixa de temperatura ideal ou ótima para o seu cultivo, que durante a realização dos experimentos, não foi atingida, causando a morte prematura desta;
- **Cuidados quanto à contaminação** – Um cultivo xênico é o ideal, porém quase nunca o real, mas de forma geral, se o ambiente estiver em equilíbrio, favorecendo assim o crescimento da microalga e inibindo o surgimento de outros microrganismos no sistema;

- **Escolha dos recipientes** – Mesmo empregando tecnologias já utilizadas no passado, os materiais e métodos de fabricação, no caso dos garrafões, mudaram inclusive as normas, o que, como descrito neste, causou mortalidade na 1ª tentativa, e na 2ª, devido às formas destes, favoreceu o surgimento de grumos bacterianos. Para coibir isto num futuro, o ideal é que além fazer uma procura mais vasta sobre os contenedores, realizar um bioensaio de maior duração, com simulação de fatores não ideais para o cultivo e observar os resultado;
- **Protocolos de trabalho** – A melhor definição dos protocolos de trabalho refletem diretamente num manejo mais eficaz e eficiente, não gerando operações que, após observadas, são inválidas e causam perda de tempo;
- **Gestão visual do manejo** – Quem já trabalha na área de microalgas reconhece a situação do cultivo apenas pela coloração que o cultivo apresenta, ou seja, a cor deste é um indicativo direto de qualidade.
- **Treinamento de pessoas envolvidas** – O ideal é que todos que estejam envolvidos com o projeto/cultivo saibam o funcionamento deste como um todo.
- **Delineamento experimental** – Buscar um desenho experimental viável, no quesito de número de réplicas e tratamentos, bem como qual será o método de processamento dos dados obtidos durante a realização do experimento, ou no caso de um cultivo, qual variação amostral para acompanhamento e controle da qualidade de produção;
- **Registro dos dados e atividades** - Estes devem estar de fácil acesso, disponíveis a todos os membros da equipe, além da definição clara do que, quando, onde e como registrar tais dados e acontecimento.

Contudo, após analisar as situações ocorridas, dos pontos críticos acima identificados e algumas sugestões de melhorias, foi elaborado um modelo a ser utilizado com *check list* nos próximos experimentos, baseando-se num conjunto de 9 tópicos, cada um com no mínimo 5 perguntas onde as respostas que nortearão novos experimentos na área de microalgas.

Check list para planejamento e execução de experimentos na produção de microalgas

1 – Revisão de dados quanto à(s) espécie(s)

- 1.1. Qual espécie de microalgas a ser utilizada?
- 1.2. Qual o tamanho desta espécie?
- 1.3. Qual faixa de temperatura aceita?
- 1.4. Qual a intensidade luminosa necessária?
- 1.5. Qual a salinidade suportada?
- 1.6. Possui taxa de crescimento relatada em bibliografia?
- 1.7. Quais necessidades nutricionais?

2. Quanto ao sistema de cultivo

- 2.1. Qual sistema de cultivo a ser utilizado?
- 2.2. Sistema aberto ou fechado?
- 2.3. Sistema interno ou externo?
- 2.4. Cultivo monoalgal ou pluri-algal?
- 2.5. Qual a finalidade do cultivo?

3. Quanto aos recipientes

- 3.1. Qual recipiente a ser utilizados?
- 3.2. Já é ou foi utilizado em algum cultivo?
- 3.3. Possui relato bibliográfico de seu uso?
- 3.4. É de fácil obtenção e manutenção?
- 3.5. Pode ser reutilizado?
- 3.6. O custo deste é viável para produção em grande escala?

4. Quanto à obtenção do inóculo

- 4.1. Possui fácil acesso ao inóculo no local?
- 4.2. É necessária a aquisição da cepa de outro local?
- 4.3. Será isolada do ambiente próximo?
- 4.4. Qual método de isolamento será utilizado?
- 4.5. O inóculo será cultivado onde?
- 4.6. Qual meio de cultura a ser utilizado?
- 4.7. Quantos dias para o preparo do inóculo?
- 4.8. Qual a quantidade necessária?

5. Sobre o Experimento

- 5.1. Qual a duração do experimento?
- 5.2. Qual o período do cultivo?
- 5.3. Como será realizada a colheita?
- 5.4. Quantos tratamentos?
- 5.5. Quantas réplicas de cada tratamento?

6. Quanto à estrutura física do local

- 6.1. Possui sala de cepário?
- 6.2. Sala de cultivo?
- 6.3. Local apropriado para descarte?
- 6.4. Ambientes climatizados para cultivo interno?
- 6.5. Fornecimento de água salgada estéril?
- 6.6. Sala seca para procedimentos laboratoriais?
- 6.7. Fornecimento de água destilada?
- 6.8. Balança de alta resolução?
- 6.9. Possui autoclave?
- 6.10. Possui Câmara de germinação?
- 6.11. Geladeira?
- 6.12. Rede de ar comprimido?

7. Quanto ao controle de parâmetros

- 7.1. Qual o método de contagem?
- 7.2. Como será feita as amostragens?
- 7.3. Quantas vezes será verificado a sanidade do cultivo?
- 7.4. Medição de pH?
- 7.5. Medição de temperatura?
- 7.6. Medição de salinidades?
- 7.7. Outros fatores a serem medidos?
- 7.8. Quantas contagens serão feitas da mesma amostra?
- 7.9. Qual o volume de cada amostra?
- 7.10. Possui algum controle do fluxo?

8. Quanto ao registro dos dados?

- 8.1. Como será feito?
- 8.2. Onde será armazenado?
- 8.3. Possui cópia de segurança?
- 8.4. Todos os envolvidos têm acesso?
- 8.5. Sabem como proceder com os dados?

9. Necessidades especiais

- 9.1. Requer algum equipamento específico para a realização deste?
 - 9.2. Requer alguma solução específica?
 - 9.3. Em falta de energia, local possui gerador ou sistema reserva de energia?
 - 9.4. Possui algum sistema reserva de água?
 - 9.5. Possui E.P.I. para utilização?
 - 9.6. Necessita de algo não relacionado anteriormente?
-

6. CONCLUSÃO

A intenção do uso deste *check list* é de melhorar a rotina da realização dos experimentos através de uma melhor definição inicial dos processos, meios, quantidades e outros, evitando a realização deste de forma desestruturada, processos ambíguos, ineficientes e ineficazes, que culminam em perdas de tempo, material e meio.

O uso deste pode ser externado a cultivos comerciais, pois com a melhoria da rotina de produção, reduzindo os mesmos aspectos anteriormente listados, culminando com a redução de custos, podendo significar num importante ponto competitivo no mercado.

Também pode ser utilizado como base para outros fins, fora da área do cultivo de microalgas, com algumas adaptações ao devido fim, para reordenar o planejamento de base, visto que com isto, acarreta em sucesso da conclusão destes projetos.

7. REFERÊNCIAS

- BARBOSA, Eduardo F.; MOURA, Dácio G.. **Lista de verificação (*Check list*) para planejamento e execução de Projetos**. Material didático utilizado na disciplina Desenvolvimento de Projetos em Educação Tecnológica do Curso de Especialização em Educação Tecnológica do CEFET-MG – 2004 - http://www.tecnologiadeprojetos.com.br/banco_objetos/%7B7522833A-68D3-4167-81FE-3091C46BE9E9%7D_Checlist%20para%20planejamento%20de%20projetos.pdf
- CAMPOS, V. B.; BARBARINO, Elisabete; LOURENÇO, Sergio O.; **Crescimento e composição química de dez species de microalgas marinhas em cultivos estanques**. Ciência Rural, Santa Maria, v.40 , n.2, p.339-347, fevereiro de 2010
- CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K.. **Ouso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis**. Revista Brasileira de Biociências (Online), v. 9, p. 542-549, 2011 - <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1797>
- CRESWELL, Leroy. **Phytoplankton culture for aquaculture feed**. SRAC Pub. Nº 5004. US. Department of Agriculture, 13pp, September 2010.
- EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). **SÍNTESE INFORMATIVA DA MARICULTURA 2012**. 2014 - <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/S%C3%ADntese-informativa-da-maricultura-2012-4.pdf>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. 2014 - <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>
- LOURENÇO, Sergio O.. **Cultivo de Microalgas Marinhas**: Princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006
- MPA (Ministérios da Pesca e Aquicultura) - **BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA 2011**. 2012 - <http://www.mpa.gov.br/index.php/informacoes-e-estatisticas/estatistica-da-pesca-e-aquicultura>
- POLI, Carlos Rogerio; *et al.* **Aquicultura**: Experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa Ltda, 2004
- REICHERT, Carolina da Cruz; REINEHR, Christian Oliveira; COSTA, Jorge Alberto Vieira. **Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 23, n.1, p. 23-28, 2006
- RICHMOND, Amos. **Handbook of Microalgal Culture**: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004